

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 484**

51 Int. Cl.:

A61L 17/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61L 31/00 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
A61L 31/04 (2006.01)
A61L 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2009** **PCT/JP2009/067367**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2010** **WO10041636**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2009** **E 09819170 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017** **EP 2345433**

54 Título: **Tapón de tejido**

30 Prioridad:

06.10.2008 JP 2008259860
11.12.2008 JP 2008316133

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.07.2017

73 Titular/es:

3-D MATRIX, LTD. (100.0%)
3-2-4, Kojimachi
Chiyoda-kuTokyo 102-0083, JP

72 Inventor/es:

TAKAMURA, KENTARO;
GOJO, SATOSHI y
KOBAYASHI, SATORU

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 624 484 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tapón de tejido

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un agente ocluyente tisular que comprende un hidrogel peptídico de autoensamblable de acuerdo con la reivindicación 1.

10 Antecedentes de la técnica

La oclusión tisular para evitar la filtración de líquidos corporales (sangre, líquidos tisulares y similares) provocada por daño tisular tiene una gran importancia en situaciones clínicas, incluyendo cirugía. La inhibición eficaz de la filtración de líquidos corporales de sitios dañados está asociada con mejora del soporte vital durante la cirugía y mejora de la calidad de vida (CDV) postquirúrgica.

15 La hemostasia se considera clínicamente importante por las siguientes razones.

- 20 1. La pérdida de sangre es una causa importante de muerte, incluyendo las causas de pérdida de sangre traumatismo grave, aneurisma, úlceras esofágicas y gástricas y ruptura de varices esofágicas. La probabilidad de muerte es alta cuando no puede detenerse inmediatamente la hemorragia.
- 25 2. La hemorragia durante la cirugía es una preocupación importante, ya que la hemorragia puede conducir a infección sistémica o disfunción orgánica. La hemorragia no solamente interfiere con el objeto de la cirugía, sino que la retirada de sangre de hemorragia es también un factor retardante en la cirugía.
- 30 3. La hemorragia también es un problema con cirugía mínimamente invasiva (cirugía laparoscópica y similares), y puede ser necesario cambiar a cirugía incisiva cuando la hemorragia no puede evitarse lo suficiente.

Para la hemostasia existen los siguientes métodos.

- 30 1. Métodos para comprimir directamente los vasos sanguíneos en el sitio de hemorragia (astricción). El inconveniente de este método es que se requieren tiempo y esfuerzo para mantener la presión, mientras que el paciente también está en riesgo de hematoma.
- 35 2. Otros métodos para detener la hemorragia por medios físicos, tales como métodos de pinzamiento o corte cerca del sitio de hemorragia, o métodos de colocación de un tapón o una esponja en el sitio de hemorragia. El inconveniente de estos métodos de detención de la hemorragia es la dificultad del control cuando la hemorragia es de numerosos microvasos.
- 40 3. Métodos para coagular la sangre por calor y cauterizar el vaso sanguíneo hemorrágico (electrocauterización). El inconveniente de dichos métodos es que el tejido circundante se somete a lesión térmica y el paciente experimenta invasión aumentada, mientras que los instrumentos médicos usados requieren una habilidad experta (el método no puede usarse fuera de una institución médica).

Para la hemostasia existen los siguientes agentes.

- 45 1. Ácido algínico
2. Esponjas de gelatina
3. Fibras de colágeno
4. Pasta de fibrina

50 Se usan con frecuencia clínicamente fibras de colágeno y pasta de fibrina como materiales de detención de la hemorragia eficaces, pero sus inconvenientes incluyen el hecho de que (1) la gelatina y las fibras de colágeno son colágeno animal y la pasta de fibrina es un producto derivado de animales obtenido usando una preparación sanguínea y trombina bovina, y por lo tanto existe el riesgo de infección, y (2) no son transparentes y por lo tanto interfieren en el sitio de cirugía.

55 Pueden inducirse en ocasiones heparinemia, en la que la función de coagulación sanguínea del paciente se reduce artificialmente durante la cirugía. Se usa heparina para suprimir la coagulación sanguínea durante la cirugía cuando se usa una máquina cardiopulmonar artificial. Una máquina cardiopulmonar artificial es ajena al cuerpo, y cuando la sangre circula a través de la máquina cardiopulmonar artificial, la sangre se coagula inmediatamente y obtura el circuito, de modo que la administración de heparina a la sangre es esencial antes de la circulación extracorpórea.

60 Las fibras de colágeno y la pasta de fibrina utilizan el sistema de coagulación sanguínea del cuerpo para hemostasia, y por lo tanto tienen un efecto hemostático menor para heparinemia. Un efecto hemostático menor tiende a conducir a mayor hemorragia y por lo tanto aumento de la necesidad de transfusión sanguínea, mientras que también se requiere un tiempo mayor para completar la hemostasia cuando se termina la circulación extracorpórea. Por lo tanto, se ha deseado un material de detención de la hemorragia que no tenga rendimiento menor con heparinemia y que no utilice la coagulación sanguínea.

Es necesaria sutura de los vasos sanguíneos no solamente para cirugía cardíaca y vascular, sino también para cirugía intraperitoneal general. Ya que se produce una pequeña cantidad de filtración de sangre de las suturas de vasos sanguíneos después de la operación, se desea un material de detención de la hemorragia con un efecto supresor persistente.

La fístula biliar o pancreática es un síntoma en el que la filtración de líquido biliar o pancreático debido a cirugía del sistema biliar o pancreatitis o cirugía pancreática afecta de forma adversa a otros órganos. En la actualidad, no se conoce ninguna sustancia que inhiba eficazmente la filtración de líquido biliar o pancreático y sea clínicamente aplicable, y por lo tanto se desea un método para evitar con seguridad y eficacia la fístula biliar y pancreática.

Además, la filtración de aire en los pulmones se conoce como un síntoma de neumotórax espontáneo que implica ruptura del quiste alveolar, o neumotórax traumático que se produce con fractura de costillas o paracentesis de catéter. Dependiendo de los síntomas puede ser necesario esperar a la curación natural, y un método de simplemente proporcionar una capa superior en el área afectada y adherirla al tejido pulmonar para ocluir el hueco del quiste se considera un método sencillo y altamente seguro para el tratamiento de neumotórax.

Continúan desarrollándose técnicas para la escisión endoscópica de lesiones con avances en tecnología de endoscopia. En particular, se están estableciendo métodos quirúrgicos para escisión endoscópica de lesiones de pólipos o cáncer de estadio temprano en el tracto gastrointestinal, incluyendo el esófago, estómago e intestinos (cáncer superficial que se cree que no tiene metástasis de ganglios linfáticos). En la desmucosación endoscópica, se inyecta habitualmente solución salina hipertónica o similares en la capa submucosa incluyendo el sitio de lesión para hinchar el sitio de lesión, y el sitio de escisión se mantiene escindiendo al mismo tiempo el tejido que contiene el sitio de la lesión por electrocauterización, por ejemplo.

En esta técnica, se inyecta una solución tal como solución salina hipertónica a la capa submucosa para separar el sitio de lesión de la capa muscular apropiada, pero soluciones de baja viscosidad tales como solución salina no pueden mantener el hinchamiento de sitio de lesión durante la cirugía, y por lo tanto se desea una solución de infusión que permita que se mantenga el hinchamiento de áreas afectadas durante el transcurso de la cirugía.

También se emplean métodos para supresión de hemorragia de sitios de escisión de lesiones por inyección de un vasoconstrictor tal como trombina a través de un catéter, pero no se han establecido medidas eficaces para la hemostasia completa, y por lo tanto también se desea un método para detener rápidamente la hemorragia postescisión.

Los avances en los tratamientos por catéter han conducido al establecimiento de métodos quirúrgicos para destruir tumores o miomas por oclusión de las arterias que fluyen a sitios de lesión, que controlan el flujo sanguíneo a los tumores y miomas. Específicamente, estos incluyen oclusión de las arterias hepáticas, oclusión de las arterias uterinas y oclusión de las arterias cerebrales.

En dichas técnicas, se infunde colágeno extraído de un animal heterogéneo, o un líquido tal como etilen-vinilalcohol, para oclusión de la arteria, pero esto plantea preocupaciones con respecto al riesgo de infección y toxicidad. Se desea por lo tanto el desarrollo de una solución de infusión sin riesgo de infección y baja toxicidad.

También se desea una solución de infusión que puede contener un agente antineoplásico o agente de contraste añadido.

Los péptidos de autoensamblaje tienen una propiedad por la que las moléculas peptídicas forman autoensamblajes dispuestos regularmente de acuerdo con su secuencia de aminoácidos. En años recientes, estos han atraído mucha atención como nuevos materiales debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

Los péptidos de autoensamblaje tienen una estructura alternante de aminoácidos hidrófilos con carga eléctrica y aminoácidos hidrófobos eléctricamente neutros, y distribución alternante de carga positiva y carga negativa, por lo que adoptan una estructura β a pH fisiológico y concentración salina.

Los aminoácidos hidrófilos que pueden usarse incluyen aminoácidos ácidos tales como ácido aspártico y ácido glutámico, y aminoácidos básicos tales como arginina, lisina, histidina y ornitina. Como aminoácidos hidrófobos pueden usarse alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano, serina, treonina o glicina.

El autoensamblaje de dichos péptidos se produce en las siguientes condiciones.

(1) Las moléculas peptídicas adoptan una estructura β en solución acuosa, en la que los aminoácidos hidrófilos con carga y aminoácidos hidrófobos eléctricamente neutros se distribuyen erróneamente en los dos lados de las moléculas peptídicas.

(2) La estructura β da como resultado una distribución eléctrica complementaria entre moléculas adyacentes.

(3) La estructura β conduce a suficientes enlaces hidrófobos entre moléculas adyacentes.

- (4) La carga eléctrica de las cadenas laterales de aminoácidos se explora por sales inorgánicas monovalentes.
- (5) Las moléculas son electrostáticamente neutras cerca del punto isoeléctrico del péptido.

Se cree que se produce autoensamblaje por el siguiente mecanismo cuando se satisfacen todas estas condiciones.

- (1) La distribución alternante de carga positiva y carga negativa en la molécula peptídica provoca atracción entre las moléculas.
- (2) Se forman enlaces hidrófobos entre las cadenas laterales de aminoácidos neutras de moléculas adyacentes.
- (3) La distribución eléctrica negativa/positiva da como resultado alineamiento complementario entre moléculas adyacentes, y se refuerza la fuerza asociativa entre las moléculas.
- (4) Los agregados moleculares se extienden gradualmente, formando nanofibras.

Las nanofibras son fibras superfina con grosores de aproximadamente 10 nm-20 nm, y se ha indicado que se agregan para formar una red y muestran una forma macroscópicamente similar a gel.

La estructura de red del gel se asemeja fuertemente a una matriz extracelular (MEC) con respecto a su tamaño de fibra y tamaño de poro, y se está estudiando su uso como un armazón para cultivo celular.

Ya que el hidrogel peptídico es biodegradable y su producto de descomposición no afecta de forma adversa al tejido, siendo al mismo tiempo altamente bioabsorbible, es adecuado para injerto y crecimiento celular.

Debido a que los péptidos de autoensamblaje son productos sintéticos químicos obtenidos por síntesis en fase sólida y no portan el riesgo de enfermedad infecciosa derivada de animales, son aún más prometedores como sustitutos de colágeno y similares, dadas las preocupaciones en años recientes con respecto a virus animales y otros agentes infecciosos desconocidos, tales como enfermedad de las vacas locas.

La aplicación de péptidos de autoensamblaje para hemostasia se indica en el documento de Patente 1, pero el video que muestra hemostasia en un sitio de incisión hepática, proporcionado en un artículo citado en los ejemplos del mismo, muestra filtración sanguínea persistente desde el extremo del sitio de incisión y no se consiguió la hemostasia completa indicada. Se conjetura que la razón para la hemostasia incompleta fue la adhesión insuficiente entre el gel de péptidos de autoensamblaje y el tejido. Por lo tanto, es necesaria una mejora adicional para aprovechar el efecto hemostático de péptidos de autoensamblaje hasta un nivel que permita su aplicación clínica. [Documento de Patente 1] Publicación de Patente Internacional N.º WO2006-116524

Divulgación de la invención

Problemas para resolver por la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un agente oclusivo tisular de péptido de autoensamblaje que pueda ocluir eficazmente sitios de daño tisular en mamíferos grandes incluyendo seres humanos y que no porten el riesgo de infección por virus y similares, así como un método para uso del mismo.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han completado la presente invención tras hallar que se muestra un efecto ocluyente tisular equivalente a o mayor que el de agentes ocluyentes tisulares existentes cuando se aplica un hidrogel de péptido de autoensamblaje como se define en la reivindicación 1 utilizado como un armazón para cultivo celular para oclusión tisular. Ha sido un problema importante que la aplicación sencilla de soluciones peptídicas acuosas a sitios de filtración de líquido corporal no proporciona un efecto ocluyente tisular suficiente. Como resultado de la investigación diligente, sin embargo, se ha descubierto que puede conseguirse un efecto ocluyente tisular suficiente y seguridad biológica retirando el exceso de líquido corporal de sitios de filtración de líquido corporal.

Específicamente, la invención se refiere a un agente oclusivo tisular que contiene un péptido como se define en la reivindicación 1 y es un péptido de autoensamblaje que muestra una estructura β en solución acuosa en presencia de pH fisiológico y/o un catión.

En este agente ocluyente tisular, el péptido es un péptido de autoensamblaje que consiste en la secuencia de aminoácidos enumerada como SEQ ID NO: 2.

El agente ocluyente tisular también comprende preferentemente fármacos moleculares pequeños para evitar la hemólisis, inflamación e infección.

Los fármacos moleculares pequeños se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en glucosa, sacarosa, sacarosa purificada, lactosa, maltosa, trehalosa, dextrano, yodo, cloruro de lisozima, dimetilisopropilazuleno, tretinoíntocoferilo, povidona de yodo, alprostadil alfadex, alcohol de anís, isoamil salicilato, alcohol α,α -dimetilfeniletílico, bacdanol, helional, sulfazina de plata, bucladesina sódica, alprostadil alfadex, sulfato de

gentamicina, clorhidrato de tetraciclina, fusidato sódico, hidrato de mupirocina cálcica e isoamil benzoato.

La invención también se refiere a agentes que comprenden el agente ocluyente tisular anteriormente mencionado, que son agentes hemostáticos para hemorragia de sangre que han reducido el potencial coagulador debido a la adición de anticoagulantes, agentes hemostáticos para superficies de heridas hemorrágicas en órganos parenquimatosos, agentes hemostáticos para hemorragia arterial y fleborragia, inhibidores de la filtración biliar de la vesícula biliar o el conducto biliar, inhibidores de la hemorragia o filtración de aire de los pulmones, agentes hemostáticos o aplicación transcáteter durante la desmucosación endoscópica, infusiones para tejido mucoso para hinchamiento de sitios de escisión, inhibidores de hemorragia y filtración de líquido corporal de sitios de escisión en métodos de escisión de resecciones de tejido mucoso que se han hinchado por infusión de líquidos al tejido mucoso, o agentes ocluyentes arteriovenosos en oclusión arteriovenosa o agentes de escleroterapia de varices usados en escleroterapia de varices. También pueden añadirse agentes antineoplásicos y/o agentes de contraste al agente ocluyente arteriovenoso o agente de escleroterapia de varices.

Efecto de la invención

El péptido de autoensamblaje como el componente principal en el agente ocluyente tisular de la invención también puede actuar como un almacén para células migrantes además de su papel como agente ocluyente, permitiendo de este modo que tenga un mayor efecto curativo después de cirugía en lugar de simple oclusión. Además, el agente ocluyente tisular de la invención tiene adhesión mejorada al tejido cuando se ha retirado el líquido corporal en exceso de un sitio de filtración de líquido corporal (p. ej., cuando se ha aplicado a un sitio de detención de hemorragia en el que se ha parado la hemorragia), y por lo tanto muestra un efecto ocluyente tisular adecuado con seguridad biológica.

El péptido de autoensamblaje como componente principal del agente ocluyente tisular de la invención puede producirse por síntesis, y por lo tanto no porta el riesgo de infección viral u otra en comparación con biomateriales derivados de tejido convencional, y es en sí mismo bioabsorbible, eliminando preocupaciones de inflamación.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1-9 y 12-14 no representan realizaciones de acuerdo con la invención.

La Figura 1 muestra una comparación entre los efectos hemostáticos de una solución peptídica acuosa 1 % y solución peptídica acuosa 3 % en un modelo de perforación con aguja de inyección de aorta abdominal. (a) Hemorragia confirmada después de punción aórtica, hemorragia perivascular (punta de la flecha; grupo tratado con solución peptídica acuosa 1 %), (b) recubrimiento de solución peptídica acuosa (grupo tratado con solución peptídica acuosa 1 %), (c) vaso sanguíneo indistinguible debido a sangre de hemorragia reanudada después de despinzar (punta de la flecha; grupo tratado con solución peptídica acuosa 1 %), (d) hemorragia confirmada después de punción aórtica, hemorragia perivascular (punta de la flecha; grupo tratado con solución peptídica acuosa 3 %), (e) recubrimiento de solución peptídica acuosa (grupo tratado con solución peptídica acuosa 3 %), (f) después de aclarar con solución salina fisiológica, puede verse un vaso sanguíneo con hemorragia completamente detenida en el centro de la fotografía (punta de la flecha; grupo tratado con solución peptídica acuosa 3 %).

La Figura 2 muestra una comparación entre los efectos hemostáticos de una solución peptídica acuosa 1 % y solución peptídica acuosa 3 % en un modelo de escisión parcial hepática. (a) Hemorragia confirmada después de escisión hepática (grupo tratado con solución peptídica acuosa 1 %), (b) recubrimiento de solución peptídica acuosa (grupo tratado con solución peptídica acuosa 1 %), (c) no se observa hemorragia de la superficie de corte después de aclarar con solución salina fisiológica (punta de la flecha; grupo tratado con solución peptídica acuosa 1 %), (d) hemorragia confirmada después de escisión hepática (grupo tratado con solución peptídica acuosa 3 %), (e) recubrimiento de solución peptídica acuosa (grupo tratado con solución peptídica acuosa 3 %), (f) hemorragia observada de superficie de corte después de aclarar con solución salina fisiológica (punta de la flecha; grupo tratado con solución peptídica acuosa 3 %).

La Figura 3 muestra una comparación histopatológica de las superficies de corte de un hígado con hemorragia detenida usando una solución peptídica acuosa e hígado de un grupo de control (solución salina fisiológica). (a) Histología intravascular (grupo tratado con solución peptídica acuosa), (b) histología intravascular (grupo tratado con solución salina fisiológica), (c) histología intravascular (grupo tratado con solución peptídica acuosa), (d) histología intravascular (grupo tratado con solución peptídica acuosa), (e) histología intravascular (grupo tratado con solución peptídica acuosa), (f) histología intravascular (grupo tratado con solución peptídica acuosa).

La Figura 4 muestra el efecto hemostático de una solución peptídica acuosa 3 % en un modelo de perforación con aguja de inyección de la aorta abdominal de conejos con función de coagulación sanguínea suprimida. (a) Condición antes de la punción aórtica, (b) hemorragia perivascular observada después de punción aórtica (punta de la flecha), (c) recubrimiento de solución peptídica acuosa, (d) hemorragia perivascular de (b) no vista después del despinzamiento (punta de la flecha).

La Figura 5 muestra el efecto hemostático de una solución peptídica acuosa 3 % que contiene sacarosa en un modelo de perforación con aguja de inyección de la aorta abdominal. (a) Condición antes de la punción aórtica, (b) hemorragia perivascular observada después de la punción aórtica (punta de la flecha), (c) recubrimiento de

solución peptídica acuosa, (d) hemorragia perivascular de (b) no vista después del despinzamiento (punta de la flecha).

La Figura 6 muestra una comparación de los efectos hemostáticos y los efectos de oclusión de filtración pulmonar de solución peptídica acuosa 3 % que contiene sacarosa y solución salina fisiológica en un modelo de filtración pulmonar. (a) Hemorragia confirmada en pulmón (punta de la flecha; grupo tratado con solución peptídica acuosa 3 % que contiene sacarosa), (b) recubrimiento de solución peptídica acuosa (punta de la flecha, grupo tratado con solución peptídica acuosa 3 % que contiene sacarosa), (c) sitio de herida sumergido en solución salina fisiológica para confirmar filtraciones de aire, pero no se observó filtración de aire o hemorragia (punta de la flecha; grupo tratado con solución peptídica acuosa 3 % que contiene sacarosa), (d) hemorragia confirmada en pulmón (punta de la flecha; grupo tratado con solución salina fisiológica), (e) recubrimiento de solución salina fisiológica (punta de la flecha; grupo tratado con solución salina fisiológica); (f) sin hemorragia definida ya que el sitio de herida se sumergió en solución salina fisiológica para confirmar filtraciones de aire, pero se observó una hemorragia continua (punta de la flecha; grupo tratado con solución salina fisiológica).

Figura 7 efecto de oclusión de la pared del conducto biliar de una solución peptídica acuosa 3 % en modelo de perforación de la pared del conducto biliar. (a) Condición antes de la punción del conducto biliar, (b) filtración de bilis confirmada después de punción del conducto biliar (punta de la flecha), (c) recubrimiento de solución peptídica acuosa (punta de la flecha), (d) filtración de bilis de (b) no observada alrededor de conducto biliar después de aclarar con solución salina fisiológica (punta de la flecha).

La Figura 8 muestra formación de hinchamiento de la mucosa y efecto hemostático de una solución peptídica acuosa 3 % en un tumor intravesical. (a) Antes de la infusión de la solución peptídica acuosa, (b) hinchamiento de área afectada confirmado después de la infusión de solución peptídica acuosa, (c) sin hemorragia en el sitio de escisión durante la escisión tumoral por electrocauterización, (d) sin hemorragia en el sitio de escisión después de escisión tumoral por electrocauterización.

La Figura 9 muestra el efecto hemostático de una solución peptídica acuosa 2 % en un modelo de incisión de mucosa gástrica. (a) hemorragia confirmada después de incisión hepática (punta de la flecha), (b) recubrimiento de solución peptídica acuosa 2 % (punta de la flecha), (c) sin hemorragia del sitio de la escisión después de aclarar con solución salina fisiológica (punta de la flecha).

La Figura 10 muestra el efecto hemostático de una solución peptídica acuosa 1 % en un modelo de transección hepática. (a) Hemorragia confirmada después de incisión hepática (punta de la flecha), (b) recubrimiento de solución peptídica acuosa IEIK9 1 % (punta de la flecha), (c) hemorragia observada del sitio de incisión después de aclarado con solución salina fisiológica (punta de la flecha), (d) hemorragia confirmada después de incisión hepática (punta de la flecha), (e) recubrimiento de solución peptídica acuosa IEIK13 1 % (punta de la flecha), (f) sin hemorragia observada del sitio de incisión después de aclarar con solución salina fisiológica (punta de la flecha), (g) hemorragia confirmada después de incisión hepática (punta de la flecha), (h) recubrimiento de solución peptídica acuosa KLD 1 % (punta de la flecha), (i) sin hemorragia observada del sitio de incisión después del aclarar con solución salina fisiológica (punta de la flecha).

La Figura 11 muestra autoensamblaje de una solución peptídica acuosa 1,5 % por bilis. (a) solución peptídica acuosa PuraMatrix 1,5 % antes de autoensamblaje, (b) solución peptídica acuosa PuraMatrix 1,5 % después de recubrimiento de bilis, (c) bilis retirada, autoensamblaje confirmado, (d) impacto físico aplicado para romper el gel autoensamblado, (e) solución peptídica acuosa IEIK9 1 % antes de autoensamblaje, (f) solución peptídica acuosa IEIK9 1 % después de recubrimiento de bilis, (g) prácticamente no se ve nada de autoensamblaje después de retirar la bilis, (h) impacto físico aplicado para romper el gel autoensamblado, (i) solución peptídica acuosa IEIK13 1 % antes del autoensamblaje, (j) solución peptídica acuosa IEIK13 1 % después de recubrir con bilis, (k) bilis retirada, autoensamblaje confirmado, (l) impacto físico aplicado para romper el gel autoensamblado, (m) solución peptídica acuosa KLD 1 % antes de autoensamblaje, (n) solución peptídica acuosa KLD 1 % después de recubrimiento de bilis, (o) bilis retirada, autoensamblaje confirmado, (p) impacto físico aplicado para romper el gel autoensamblado.

La Figura 12 muestra el efecto de embolización de la vena porta con una solución peptídica acuosa 3 %. (a), (b) Embolización de la vena porta confirmada (punta de la flecha).

La Figura 13 muestra autoensamblaje de una solución peptídica acuosa que contiene iopamidol.

(a) solución peptídica acuosa 3 % que contiene iopamidol antes de autoensamblaje, (b) solución peptídica acuosa 3 % que contiene iopamidol después de recubrimiento de medio de cultivo celular, (c) medio de cultivo celular retirado, autoensamblaje confirmado, (d) solución peptídica acuosa 0,0468 % que contiene iopamidol antes del autoensamblaje, (e) solución peptídica acuosa 0,0468 % que contiene iopamidol después de recubrimiento del medio de cultivo celular, (f) medio de cultivo celular retirado, autoensamblaje confirmado.

La Figura 14 muestra autoensamblaje de una solución peptídica acuosa 3 % que contiene iopamidol después del pase del catéter (punta de la flecha).

El agente ocluyente tisular de la invención se explicará ahora en detalle.

El componente principal del agente ocluyente tisular de la invención es un péptido de autoensamblable que es un péptido anfifílico como se define en la reivindicación 1 y muestra una estructura β en solución acuosa en presencia de pH fisiológico y/o un catión.

De acuerdo con la invención, el pH fisiológico es pH 6-8, preferentemente pH 6,5-7,5 y más preferentemente pH 7,3-7,5. Un "catión" de acuerdo con la invención es, por ejemplo, ion sodio o ion potasio 5 mM-5 M.

El péptido IEIK13 tiene la secuencia (Ac-(IEIK)₃I-CONH₂) (SEQ ID NO: 2). Tiene una longitud de aproximadamente 5 nm y aunque sus soluciones son líquidas a pH ácido, experimenta autoorganización después del cambio a pH neutro, formando nanofibras con diámetros de aproximadamente 10 nm, que provocan la gelificación de la solución peptídica.

PuraMatrix™, un péptido que no es parte de la presente invención es un péptido anfifílico que tiene una secuencia de aminoácidos con repeticiones alternas de arginina con carga positiva y ácido aspártico con carga negativa como aminoácidos hidrófilos, y alanina como aminoácido hidrófobo, IEIK13 es un péptido anfifílico que tiene una secuencia de aminoácidos con repeticiones alternas de lisina con carga positiva y ácido glutámico con carga negativa como aminoácidos hidrófilos e isoleucina como un aminoácido hidrófobo, y KLD, que tampoco es parte de la presente invención es un péptido anfifílico que tiene una secuencia de aminoácidos con repeticiones alternas de lisina con carga positiva y ácido aspártico con carga negativa como aminoácidos hidrófilos y leucina como un aminoácido hidrófobo; el autoensamblaje de los péptidos se debe a enlaces de hidrógeno y enlaces hidrófobos entre las moléculas peptídicas por los aminoácidos que componen los péptidos.

En el péptido de autoensamblaje usado para la invención, el diámetro de la nanofibra es de 10-20 nm y el tamaño de poro es de 5-200 nm, como promedios. Estos intervalos de valores numéricos son aproximadamente iguales que el colágeno, que es una matriz extracelular natural.

El pH fisiológico y la concentración salina son condiciones para el autoensamblaje del péptido de autoensamblable de la invención. La presencia de un ion metálico alcalino monovalente es especialmente importante. Es decir, el ion sodio e ion potasio presentes en grandes cantidades en el cuerpo ayudan a promover la gelificación. Una vez que se ha producido gelificación, el gel no se descompone incluso en condiciones desnaturalizantes de proteínas comunes tales como alta temperatura o con agentes desnaturalizantes tales como ácidos, álcalis, proteasas, urea, clorhidrato de guanidina o similares.

Los péptidos de autoensamblaje, tales como PuraMatrix™, son secuencias peptídicas que carecen de un motivo fisiológicamente activo definido, y por lo tanto la función celular intrínseca no está alterada. Los motivos fisiológicamente activos controlan numerosos fenómenos intracelulares tales como transcripción, y la presencia de motivos fisiológicamente activos puede conducir a la fosforilación de proteínas de superficie celular o intracitoplasmáticas por enzimas que reconocen los motivos. Cuando está presente un motivo fisiológicamente activo en un agente ocluyente tisular peptídico, la transcripción de proteínas con diversas funciones puede activarse o suprimirse. Los péptidos de autoensamblaje, tales como PuraMatrix™, carecen de dichos motivos fisiológicamente activos y por lo tanto no conllevan este riesgo.

Ya que el péptido de autoensamblaje usado para la invención se produce por síntesis química, este no contiene componentes no identificados derivados de la matriz extracelular de otro animal. Esta propiedad elimina por lo tanto las preocupaciones de infección, incluyendo BSE, haciendo el péptido altamente seguro incluso para uso médico.

Además, un péptido de autoensamblaje compuesto de aminoácidos naturales también tiene biocompatibilidad y biodegradabilidad satisfactorias, y se ha indicado que la infusión de PuraMatrix™ en músculo cardíaco murino, por ejemplo, da como resultado la infiltración de células en la PuraMatrix™ y formación de tejido normal. El tiempo de descomposición difiere dependiendo de las condiciones tales como la localización de la infusión, pero las fibras se descomponen y se secretan en aproximadamente 2 a 8 semanas después de la infusión.

El agente ocluyente tisular de la invención puede contener además fármacos moleculares pequeños añadidos. No hay ninguna restricción particular sobre dichos fármacos moleculares pequeños, y puede mencionarse la glucosa, sacarosa, sacarosa purificada, lactosa, maltosa, trehalosa, dextrano, yodo, cloruro de lisozima, dimetilisopropilazuleno, tretinoín tocoferilo, povidona de yodo, alprostadil alfadex, alcohol de anís, isoamil salicilato, alcohol α,α -dimetilfeniletilico, bacdanol, helional, sulfazina de plata, bucladesina sódica, alprostadil alfadex, sulfato de gentamicina, clorhidrato de tetraciclina, fusidato sódico, hidrato de mupirocina cálcica e isoamil benzoato.

Puede añadirse un azúcar al agente ocluyente tisular de la invención para mejorar la presión osmótica de la solución de hipotonicidad a isotonicidad sin reducir el efecto ocluyente tisular, permitiendo de ese modo que aumente la seguridad biológica.

El agente ocluyente tisular de la invención puede estar en forma de una solución, un gel o similares. Ya que el péptido de autoensamblaje gelifica en respuesta a cambios en el pH de la solución y la concentración salina, este puede distribuirse como un fármaco líquido que gelifica tras el contacto con el cuerpo durante la aplicación.

Los modos de uso clínico incluyen jeringas equipadas con cilindros o pipetas que están precargadas con solución química que contiene componentes tales como péptidos de autoensamblaje (jeringas precargadas), o métodos para proporcionar una solución química a una jeringa o una microplaca de pipeta por un medio que proporciona los

componentes a través de la abertura de la jeringa o microplaca de pipeta (un aspirador o una válvula), y aplicándolos al área afectada a través de la sección de descarga. Se usa en ocasiones una construcción con dos o más jeringas o pipetas.

- 5 Los componentes pueden usarse como un revestimiento en un instrumento tal como un stent o catéter, para suprimir la filtración de líquido corporal.

Además, los componentes pueden anclarse en un soporte tal como una gasa o un vendaje, o un revestimiento, que se usa habitualmente en el campo. Los componentes también pueden empaparse en una esponja para su uso.

- 10 Además, puede prepararse un pulverizador atomizador cargado con un polvo o una solución de los componentes. Cuando se usa dicha pulverización para pulverizar en un área afectada, el pH y la concentración salina aumentan tras el contacto con el cuerpo que provoca gelificación, y por lo tanto esta forma puede aplicarse para una mayor diversidad de sitios y condiciones que una forma de gel.

- 15 El agente ocluyente tisular de la invención se explicará ahora en mayor detalle mediante los siguientes ejemplos, pero la invención no se limita a los mismos siempre que se mantenga su esencia y ámbito de aplicación.

[Ejemplo de referencia 1]

- 20 Efectos hemostáticos de solución peptídica acuosa 1 % y solución peptídica acuosa 3 % en modelo de perforación con aguja de inyección de tallo de vena porta/aorta abdominal de conejo.

- 25 Se preparó un modelo de perforación con aguja de inyección de tallo de vena porta y aorta abdominal de conejo con pinza vascular, y se evaluaron los efectos hemostáticos de solución peptídica acuosa 1 % y solución peptídica acuosa 3 %.

<Materiales>

- 30 Soluciones peptídicas acuosas

1. Solución peptídica acuosa 1 % (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc; concentración: p/vol)
2. Solución peptídica acuosa 3 % (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc; concentración p/vol)

- 35

Animales

- 40 Conejos blancos japoneses (3,0-4,0 kg, Japan White, convencionales, obtenidos de Funabashi Farm Co., Ltd.). Los animales se criaron con microgránulos de cría (JA Higashinihon Kumiai Shiryou) proporcionados en una habitación de cría controlada a temperatura ambiente de 25 °C, una humedad del 65 % y un tiempo de iluminación de 12 horas (7:00-19:00), y agua proporcionada libremente con una botella de agua. El ayuno fue desde la mañana del día del ensayo, con agua proporcionada libremente.

- 45 <Método>

- Se administró por vía subcutánea a los conejos inyección de Celactar 2 % (3 mg/kg) (contenido de 2,0 g como xilazina en 100 ml, producto de Bayer Ltd.) y después se administró ketamina (contenido de 50 mg, ketamina en 1 ml, producto de Fuji Chemical Industries, Ltd.) por vía intravenosa (10 mg/kg) para anestesia.
- Los conejos se laparotomizaron por sección media. Se expusieron aproximadamente 10 cm de la aorta abdominal y tallo de la vena porta, cada vaso sanguíneo se extrajo del tejido circundante, y la aorta abdominal se perforó con una aguja de inyección de 23G (Terumo Corp.) mientras que el tallo de la vena porta se perforó con una aguja de inyección de 26G (Terumo Corp.).
- Tras confirmar la hemorragia, se pinzó el flujo sanguíneo en el extremo periférico y extremo central con una pinza hemostática, y después de retirar la sangre de hemorragia con solución salina fisiológica y gasa, se trató inmediatamente con la solución peptídica acuosa.
- Después de 1-2 minutos de tratamiento, se liberó el flujo sanguíneo y se examinó visualmente la presencia de hemorragia del sitio de perforación.

- 60 <Resultados>

La Fig. 1 muestra el efecto hemostático de la solución peptídica acuosa en la hemorragia del vaso sanguíneo en este ejemplo. Como se ve en la Tabla 1, dos de dos conejos del modelo de perforación de la aorta abdominal demostraron hemostasia completa con solución peptídica acuosa 3 %. Con solución peptídica acuosa 1 %, sin embargo, ambos conejos tuvieron hemorragia en chorro después de liberación de la pinza, y por lo tanto la hemostasia no fue completa. En el modelo de perforación de tallo de la vena porta, dos de los casos también

- 65

demonstraron hemostasia completa con solución peptídica acuosa 3 %, pero tuvieron fleborragia persistente con solución peptídica acuosa 1 %.

[Tabla 1]

N.º	Solución peptídica acuosa	Sitio de perforación	Tiempo de procedimiento	Resultado	Observaciones
1	3 %	Aorta abdominal	1:00	G	Hemostasia completa
2	3 %	Aorta abdominal	1:00	G	Hemostasia completa
3	1 %	Aorta abdominal	2:00	P	Hemorragia en chorro después de liberación de bloqueo
4	1 %	Aorta abdominal	2:00	P	Hemorragia en chorro después de liberación de bloqueo
5	3 %	Tallo de la vena porta	2:00	G	Hemostasia completa
6	3 %	Tallo de la vena porta	1:00	G	Hemostasia completa
7	1 %	Tallo de la vena porta	2:00	P	Hemorragia continua después de liberación de bloqueo

[Ejemplo de referencia 2]

Efectos hemostáticos de solución peptídica acuosa 1 % y solución peptídica acuosa 3 % en modelo de resección de hígado parcial de conejo.

Se preparó un modelo de resección de hígado parcial de conejo y se evaluaron los efectos hemostáticos de solución peptídica acuosa 1 % y solución peptídica acuosa 3 %.

<Materiales>

Soluciones peptídicas acuosas

1. Solución peptídica acuosa 1 % (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)
2. Solución peptídica acuosa 3 % (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

Animales

Conejos blancos japoneses (3,0-4,0 kg, Japan White, convencionales, obtenidos de Funabashi Farm Co., Ltd.). Los animales se criaron con microgránulos de cría (JA Higashinihon Kumiai Shiryō) proporcionados en una habitación de cría controlada a temperatura ambiente de 25 °C, una humedad de 65 % y un tiempo de iluminación de 12 horas (7:00-19:00), y agua proporcionada libremente con una botella de agua. El ayuno fue desde la mañana del día del ensayo, con agua proporcionada libremente.

<Método>

- Se administró por vía subcutánea a los conejos (3 mg/kg) inyección de Celactar 2 % (contenido de 2,0 g como xilazina en 100 ml, producto de Bayer Ltd.) y después se administró por vía intravenosa (10 mg/kg) ketamina (contenido de 50 mg como ketamina en 1 ml, producto de Fuji Chemical Industries, Ltd.) para anestesia.
- Los conejos se laparotomizaron por sección media, y se escindió pronunciadamente el lóbulo izquierdo o derecho hepático a un tamaño de aproximadamente 5 cm de anchura x 3 cm de longitud desde el extremo usando un escalpelo, para preparar una sección de hígado.
- Después de confirmar la hemorragia en chorro de la superficie reseca, el parénquima de hígado incluyendo las arterias, la vena porta y venas se astringió manualmente para bloquear inmediatamente el flujo sanguíneo, y la sangre de hemorragia se retiró con solución salina fisiológica y gasa, después de lo cual la superficie del hígado resaca preparada se trató con solución peptídica acuosa.
- Se liberó flujo sanguíneo 1-2 minutos después del tratamiento, la solución peptídica acuosa que se gelificó se retiró por solución salina fisiológica, y se confirmó visualmente la presencia de cualquier hemorragia de la superficie del hígado resaca.

- La superficie del hígado resecado en la que se vio un efecto hemostático se fijó con formalina a 20 % y se evaluó histopatológicamente por tinción con HE.

<Resultados>

La Fig. 2 muestra el efecto hemostático de las soluciones peptídicas acuosas en la hemorragia de la superficie de hígado resecada en este ejemplo. Como se ve en la Tabla 2, dos de los dos conejos mostraron una hemostasia completa con solución peptídica acuosa 1 %, pero se observó una hemostasia completa solamente en 1 de 4 conejos con solución peptídica acuosa 3 %. En la observación histológica, se confirmó la oclusión de vasos sanguíneos en la superficie vascular debido a contacto estrecho de la solución peptídica acuosa gelificada con la superficie de hígado resecado (Fig. 3).

[Tabla 2]

N.º	Concentración	Tiempo de procedimiento	Resultado	Observaciones
1	3 %	2:00	P	Hemorragia continua de la aorta
2	3 %	2:00	G	Hemostasia completa
3	3 %	1:00	F	Goteo de sangre
4	3 %	2:00	P	Hemorragia continua de la aorta
5	1 %	2:00	G	Hemostasia completa
6	1 %	2:00	G	Hemostasia completa

[Ejemplo de referencia 3]

Efecto hemostático de solución peptídica acuosa en modelo de perforación con aguja de inyección de la aorta abdominal de conejos con función de coagulación sanguínea suprimida.

El efecto hemostático de la solución peptídica acuosa en conejos a los que se administró un anticoagulante (heparina) se evaluó en un modelo de perforación con aguja de inyección de aorta abdominal.

<Materiales>

Solución peptídica acuosa

Solución peptídica acuosa 3 % (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

Animales

Conejos blancos japoneses (3,0-4,0 kg, Japan White, convencionales, obtenidos de Funabashi Farm Co., Ltd.). Los animales se criaron con microgránulos de cría (JA Higashinihon Kumiai Shiryō) proporcionados en una habitación de cría controlada a una temperatura ambiente de 25 °C, una humedad del 65 % y un tiempo de iluminación de 12 horas (7:00-19:00), y agua proporcionada libremente con una botella de agua. El ayuno fue desde la mañana del día del ensayo, con agua proporcionada libremente.

<Método>

- Se administró a los conejos por vía subcutánea (3 mg/kg) inyección de Celactar 2 % (contenido de 2,0 g como xilazina en 100 ml, producto de Bayer Ltd.) y después se administró por vía intravenosa (10 mg/kg) ketamina (contenido de 50 mg como ketamina en 1 ml, producto de Fuji Chemical Industries, Ltd.) para anestesia.

- Se administraron 1.000 unidades de heparina (Novo-Heparina para inyección, 5.000 unidades, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.) a través de la vena cava inferior para reducir artificialmente la función de coagulación sanguínea.

- Los conejos se laparotomizaron por sección media. Se expusieron aproximadamente 10 cm de la aorta abdominal, se retiró el vaso sanguíneo del tejido circundante y se perforó el vaso con una aguja de inyección de 26G, 25G o 23G (Terumo Corp.).

- Tras confirmar la hemorragia, se pinzó el flujo sanguíneo en el extremo periférico y en el extremo central con una pinza hemostática y después de retirar la sangre de hemorragia con solución salina fisiológica y gasa, se trató inmediatamente con la solución peptídica acuosa.

- Después de 1-2 minutos de tratamiento, se liberó el flujo sanguíneo y se examinó visualmente la presencia de hemorragia.

<Resultados>

La Fig. 4 muestra el efecto hemostático de la solución peptídica acuosa en la hemorragia de la aorta abdominal de conejos con función de coagulación sanguínea reducida en este ejemplo. Como se ve en la Tabla 3, se observó hemostasia completa con solución peptídica acuosa 3 % en los modelos de perforación con aguja de inyección de 26G, 25G y 23G.

[Tabla 3]

N.º	Tamaño de la aguja (G)	Tiempo de procedimiento	Resultado	Observaciones
1	23G	1:00	G	Hemostasia completa
2	25G	1:00	G	Hemostasia completa
3	25G	1:00	G	Hemostasia completa
4	26G	2:00	G	Hemostasia completa

[Ejemplo de referencia 4]

Efecto hemostático de soluciones peptídicas acuosas que contienen azúcar en modelo de perforación con aguja de inyección del tallo de la vena porta/aorta abdominal del conejo.

Los efectos hemostáticos de soluciones peptídicas acuosas que contenían azúcar se evaluaron usando un modelo de perforación con aguja de inyección del tallo de la vena porta/aorta abdominal.

<Materiales>

Soluciones peptídicas acuosas

1. Soluciones peptídicas acuosas que contienen sacarosa (Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc; concentraciones: 2 % y 3 %, sacarosa: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., concentración 10 %)
2. Solución peptídica acuosa 2 % que contiene glucosa (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc; glucosa: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., concentración 5 %)
3. Solución peptídica acuosa 2 % que contiene trehalosa (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc; trehalosa: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., concentración 5 %)
4. Solución peptídica acuosa 3 % (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)
5. Solución peptídica acuosa 2 % (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

Animales

Conejos blancos japoneses (3,0-4,0 kg, Japan White, convencionales, obtenidos de Funabashi Farm Co., Ltd.). Los animales se criaron con microgránulos de cría (JA Higashinihon Kumiai Shiryō) proporcionados en una habitación de cría controlada a una temperatura ambiente de 25 °C, una humedad de 65 % y un tiempo de iluminación de 12 horas (7:00-19:00), y agua proporcionada libremente con una botella de agua. El ayuno fue desde la mañana del día del ensayo, con agua proporcionada libremente.

<Método>

- Se administró por vía subcutánea a los conejos (3 mg/kg) inyección de Celactar 2 % (contenido de 2,0 g como xilazina en 100 ml, producto de Bayer Ltd.) y después se administró por vía intravenosa (10 mg/kg) ketamina (contenido de 50 mg como ketamina en 1 ml, producto de Fuji Chemical Industries, Ltd.) para anestesia.
- Los conejos se laparotomizaron por sección media. Se expusieron aproximadamente 10 cm de la aorta abdominal y tallo de la vena porta, cada vaso sanguíneo se retiró del tejido circundante, y la aorta abdominal se perforó con una aguja de inyección de 26G, 25G o 23G (Terumo Corp.) mientras que el tallo de la vena porta se perforó con una aguja de inyección de 26G (Terumo Corp.).
- Tras confirmar la hemorragia, se pinzó el flujo sanguíneo en el extremo periférico y en el extremo central con una pinza hemostática, y después de retirar la sangre de hemorragia con solución salina fisiológica y gasa, se trató inmediatamente con la solución peptídica acuosa.
- Después de 1-2 minutos de tratamiento, se liberó el flujo sanguíneo y se examinó visualmente la presencia de hemorragia.

<Resultados>

La Fig. 5 muestra el efecto hemostático de una solución peptídica acuosa que contiene azúcar en la hemorragia de un vaso sanguíneo en este ejemplo. Como se ve en la Tabla 4, el efecto hemostático de la solución peptídica acuosa 3 % que contiene sacarosa fue equivalente al de solución peptídica acuosa 3 % en los modelos de perforación con aguja de inyección de 23G, 25G y 26G de la aorta abdominal.

Como se ve en la Tabla 5, los efectos hemostáticos de solución peptídica acuosa 2 %, solución peptídica acuosa 2 % que contiene sacarosa, solución peptídica acuosa 2 % que contiene glucosa y solución peptídica acuosa 2 % que contiene trehalosa fueron equivalentes en el modelo de perforación con aguja de inyección de 26G de tallo de la vena porta.

[Tabla 4]

N.º	Solución peptídica acuosa	Sitio de perforación	Tamaño de la aguja (G)	Tiempo de procedimiento	Resultado	Observación
1	3 %	Aorta abdominal	23	1:00	G	Hemostasia completa
2	3 %	Aorta abdominal	23	1:00	G	Hemostasia completa
3	3 %	Aorta abdominal	25	1:00	G	Hemostasia completa
4	3 %	Aorta abdominal	25	1:00	G	Hemostasia completa
5	3 %	Aorta abdominal	25	1:00	G	Hemostasia completa
6	3 %	Aorta abdominal	26	2:00	G	Hemostasia completa
7	3 % que contiene sacarosa	Aorta abdominal	23	2:00	G	Hemostasia completa
8	3 % que contiene sacarosa	Aorta abdominal	23	1:00	G	Hemostasia completa
9	3 % que contiene sacarosa	Aorta abdominal	23	2:00	G	Hemostasia completa
10	3 % que contiene sacarosa	Aorta abdominal	23	2:00	P	Hemorragia en chorro
11	3 % que contiene sacarosa	Aorta abdominal	25	2:00	G	Hemostasia completa
12	3 % que contiene sacarosa	Aorta abdominal	26	1:00	G	Hemostasia completa
13	3 % que contiene sacarosa	Aorta abdominal	26	1:00	G	Hemostasia completa
14	3 % que contiene sacarosa	Aorta abdominal	26	2:00	G	Hemostasia completa
15	3 % que contiene sacarosa	Aorta abdominal	26	2:00	G	Hemostasia completa
16	3 % que contiene sacarosa	Aorta abdominal	26	2:00	G	Hemostasia completa

[Tabla 5]

N.º	Solución peptídica acuosa	Sitio de perforación	Tamaño de la aguja (G)	Tiempo de procedimiento	Resultado	Observación
1	2%	Tallo de la vena porta	26G	2:00	G	Hemostasia completa
2	2%	Tallo de la vena porta	26G	2:00	G	Hemostasia completa
3	2 % que contiene glucosa	Tallo de la vena porta	26G	2:00	G	Hemostasia completa
4	2 % que contiene glucosa	Tallo de la vena porta	26G	2:00	G	Hemostasia completa
5	2 % que contiene glucosa	Tallo de la vena porta	26G	2:00	P	Hemorragia continua
6	2 % que contiene sacarosa	Tallo de la vena porta	26G	2:00	G	Hemostasia completa
7	2 % que contiene trehalosa	Tallo de la vena porta	26G	2:00	G	Hemostasia completa

[Ejemplo de referencia 5]

- 5 Efecto de bloqueo de filtración de pulmón de solución peptídica acuosa que contiene sacarosa en modelo de filtración de pulmón de conejo.

Se preparó un modelo de filtración de pulmón de conejo, y se compararon los efectos de bloqueo de filtración de pulmón de una solución peptídica acuosa 3 % que contiene sacarosa y solución salina fisiológica.

10 <Materiales>

Soluciones peptídicas acuosas

- 15 1. Solución peptídica acuosa 3 % que contiene sacarosa (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc; sacarosa: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., concentración: 10%)
2. Solución salina fisiológica (producto de Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.)

Animales

- 20 Conejos blancos japoneses (3,0-4,0 kg, Japan White, convencionales, obtenidos de Funabashi Farm Co., Ltd.). Los animales se criaron con microgránulos de cría (JA Higashinihon Kumiai Shiryō) proporcionados en una habitación de cría controlada a una temperatura ambiente de 25 °C, una humedad de 65 % y un tiempo de iluminación de 12 horas (7:00-19:00), y agua proporcionada libremente con una botella de agua. El ayuno fue desde la mañana del día del ensayo, con agua proporcionada libremente.

<Método>

- 30 • Se administró por vía subcutánea a los conejos (3 mg/kg) inyección de Celactar 2 % (contenido de 2,0 g como xilazina en 100 ml, producto de Bayer Ltd.) y después se administró por vía intravenosa (10 mg/kg) ketamina (contenido de 50 mg como ketamina en 1 ml, producto de Fuji Chemical Industries, Ltd.) para anestesia.
• Los conejos se toracotomizaron con asistencia respiratoria con un respirador artificial. Los pulmones se expusieron y se hirieron de forma contundente con fórceps para crear filtración pulmonar con hemorragia.
• Después de retirar la sangre de hemorragia con solución salina fisiológica y gasa, la superficie hemorrágica se trató con solución peptídica acuosa 3 % que contenía sacarosa y solución salina fisiológica.
35 • Aproximadamente 30 segundos después del tratamiento, se confirmó visualmente la presencia de hemorragia y filtración de aire de la filtración del pulmón en la solución salina fisiológica.

<Resultados>

- 40 La Fig. 6 muestra el efecto de bloqueo de filtración pulmonar de la solución peptídica acuosa que contiene sacarosa de este ejemplo. Como se ve en la Tabla 6, se confirmará la hemostasia completa y el bloqueo de la filtración pulmonar con solución peptídica acuosa 3 % que contenía sacarosa, pero se observó hemorragia persistente y

filtración de aire de la filtración pulmonar con solución salina fisiológica.

[Tabla 6]

Solución	Tiempo de procedimiento	Resultado	Observaciones
3 % que contiene sacarosa	0:30	G	Hemostasia completa. Sin filtración de aire de la filtración pulmonar
Solución salina fisiológica	-	P	Hemorragia continua y filtración de aire de la filtración pulmonar

5 [Ejemplo de referencia 6]

Efecto de oclusión de la pared del conducto biliar de solución peptídica acuosa en el modelo de perforación con aguja de inyección de conducto biliar de conejo.

- 10 Se preparó un modelo de perforación del conducto biliar con aguja de inyección de conejo, y se evaluó el efecto de oclusión de la pared del conducto biliar de una solución peptídica acuosa.

<Materiales>

15 Solución peptídica acuosa

Solución peptídica acuosa 3 % (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.).

Animales

- 20 Conejos blancos japoneses (3,0-4,0 kg, Japan White, convencionales, obtenidos de Funabashi Farm Co., Ltd.). Los animales se criaron con microgránulos de cría (JA Higashinohon Kumiai Shiryō) proporcionados en una habitación de cría controlada a una temperatura ambiente de 25 °C, una humedad del 65 % y un tiempo de iluminación de 12 horas (7:00-19:00), y agua proporcionada libremente con una botella de agua. El ayuno fue desde la mañana del día del ensayo, con agua proporcionada libremente.

<Método>

- 30 • Se administró por vía subcutánea a los conejos (3 mg/kg) inyección de Celactar 2 % (contenido de 2,0 g como xilazina en 100 ml, producto de Bayer Ltd.) y después se administró por vía intravenosa (10 mg/kg) ketamina (contenido de 50 mg como ketamina en 1 ml, producto de Fuji Chemical Industries, Ltd.) para anestesia.
- 35 • Los conejos se laparotomizaron por sección media. Se expusieron aproximadamente 10 cm del conducto biliar, y después de la retirada del tejido circundante, el conducto biliar se perforó con una aguja de inyección de 26G.
- Después de confirmar la descarga de bilis y el flujo continuo de bilis, se bloqueó el flujo de bilis con una pinza hemostática.
- La bilis filtrada se retiró con solución salina fisiológica y gasa, y después se trató con solución peptídica acuosa 3 %.
- Después de 2 minutos de tratamiento, se liberó el bloqueo de flujo de bilis y se examinó visualmente la presencia de flujo de bilis desde el sitio de perforación.

<Resultados>

- 45 La Fig. 7 muestra el efecto de oclusión de la pared del conducto biliar de la solución peptídica acuosa en este ejemplo. Como se ve en la Tabla 7, se observó un efecto de oclusión de la pared del conducto biliar completa con solución peptídica acuosa 3 %.

[Tabla 7]

N.º	Tamaño de la aguja (G)	Tiempo de procedimiento	Resultado	Observaciones
1	26G	2:00	G	Solución peptídica acuosa gelificada con bilis, sitio de perforación del conducto biliar completamente bloqueado

[Ejemplo de referencia 7]

- 50 Elevación sostenida del sitio de escisión y efecto hemostático de solución peptídica acuosa con tumorectomía intravesical canina.

- 55 Se inyectaron por vía submucosa soluciones peptídicas acuosas en la vejiga durante la tumorectomía intravesical canina, y se evaluaron la elevación sostenida y los efectos hemostáticos de las soluciones peptídicas acuosas en el sitio de escisión.

<Materiales>

Solución peptídica acuosa

5 Solución peptídica acuosa 3 % (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

Animales

Perros (machos)

10

<Método>

Se llevó a cabo tumorectomía intravesical canina con tratamiento de anestesia general, por el siguiente procedimiento.

15

- Después de la incisión hipogástrica con un escalpelo de electrocauterización (Erbe, Inc.), se usó el escalpelo de electrocauterización para incisión de la vejiga para exponer el tumor intravesical (tumor pedunculado con un diámetro en el sitio de base de aproximadamente 0,5 cm que está elevado de la mucosa vesical).

20

- Se inyectó por vía submucosa solución peptídica acuosa 3 % alrededor de la base tumoral en 4 inyecciones de 0,5 ml cada una, y se confirmó la elevación del tumor en la mucosa.

- Después de elevar el tumor, se escindió el tumor con un escalpelo electrónico.

- El tiempo desde inyección de solución peptídica acuosa hasta escisión tumoral completa fue de aproximadamente 2 minutos.

25

<Resultados>

Como se muestra en la Fig. 8, los tumores elevados por inyección de solución peptídica acuosa en la mucosa vesical, y el estado elevado se mantuvieron incluso durante la escisión. No se observó hemorragia durante o después de la escisión tumoral.

30

[Ejemplo 8]

Efecto hemostático de solución peptídica acuosa 2 % en el modelo de incisión de mucosa gástrica de conejo

35

Se preparó un modelo de hemorragia de incisión de mucosa gástrica de conejo, y se evaluó el efecto hemostático de una solución peptídica acuosa 2 %.

<Materiales>

40

Solución peptídica acuosa

Solución peptídica acuosa 1,2 % (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

Animales

45

Conejos blancos japoneses (3,0-4,0 kg, Japan White, convencionales, obtenidos de Funabashi Farm Co., Ltd.). Los animales se criaron con microgránulos de cría (JA Higashinohon Kumiai Shiryou) proporcionados en una habitación de cría controlada a una temperatura ambiente de 25 °C, una humedad del 65 % y un tiempo de iluminación de 12 horas (7:00-19:00), y agua proporcionada libremente con una botella de agua. El ayuno fue desde la mañana del día del ensayo, con agua proporcionada libremente.

50

<Método>

55 • Se administró por vía subcutánea a los conejos (3 mg/kg) inyección de Celactar 2 % (contenido de 2,0 g como xilazina en 100 ml, producto de Bayer Ltd.) y después se administró por vía intravenosa (10 mg/kg) ketamina (contenido de 50 mg como ketamina en 1 ml, producto de Fuji Chemical Industries, Ltd.) para anestesia.

- Los conejos se laparotomizaron por sección media y se realizaron incisiones en los estómagos, después de lo cual se expuso la mucosa gástrica y se realizó una incisión pronunciada con un escalpelo hasta aproximadamente 1 cm para inducir hemorragia.

60

- Después de confirmar que la sangre salía de la incisión, la sangre se retiró en la medida de lo posible con la gasa y se trató la incisión de la mucosa gástrica con solución peptídica acuosa.

- La solución peptídica acuosa gelificada se retiró 1 minuto después del tratamiento usando solución salina fisiológica, y se confirmó visualmente la presencia de cualquier hemorragia de la incisión de la mucosa gástrica.

<Resultados>

La Fig. 9 muestra el efecto hemostático de la solución peptídica acuosa en hemorragia de la incisión de la mucosa gástrica en este ejemplo. No se observó hemorragia después de aplicar la solución peptídica acuosa.

[Ejemplo 9]

Efecto hemostático de solución peptídica acuosa 1 % en modelo de transección hepática de conejo

Se preparó un modelo de hemorragia de transección hepática de conejo, y se evaluó el efecto hemostático de una solución peptídica acuosa 1 %.

<Materiales>

• Soluciones peptídicas acuosas. Las solución 1 y 3 no son parte de la invención.

1. Solución peptídica acuosa 1 % (secuencia peptídica: IEIK9 (SEQ ID NO: 4), CPC Scientific, Inc)
2. Solución peptídica acuosa 1 % (secuencia peptídica: IEIK13, CPC Scientific, Inc)
3. Solución peptídica acuosa 1 % (secuencia peptídica: KLD, CPC Scientific, Inc)

Animales

Conejos blancos japoneses (3,0-4,0 kg, Japan White, convencionales, obtenidos de Funabashi Farm Co., Ltd.). Los animales se criaron con microgránulos de cría (JA Higashinihon Kumiai Shiryō) proporcionados en una habitación de cría controlada a una temperatura ambiente de 25 °C, una humedad del 65 % y un tiempo de iluminación de 12 horas (7:00-19:00), y agua proporcionada libremente con una botella de agua. El ayuno fue desde la mañana del día del ensayo, con agua proporcionada libremente.

<Método>

- Se administró por vía subcutánea a los conejos (3 mg/kg) inyección de Celactar 2 % (contenido de 2,0 g como xilazina en 100 ml, producto de Bayer Ltd.) y después se administró por vía intravenosa (10 mg/kg) ketamina (contenido de 50 mg como ketamina en 1 ml, producto de Fuji Chemical Industries, Ltd.) para anestesia.
- Los conejos se laparotomizaron por sección media y se expusieron los lóbulos hepáticos izquierdos y se transectaron pronunciadamente con un escalpelo hasta aproximadamente 1 cm para inducir hemorragia.
- Después de confirmar la hemorragia exudativa de la incisión, la sangre se retiró en la medida de lo posible con gasa y la incisión hepática se trató con solución peptídica acuosa.
- La solución peptídica acuosa gelificada se retiró 1 minuto después del tratamiento usando solución salina fisiológica, y se confirmó visualmente la presencia de cualquier hemorragia de la incisión hepática.

<Resultados>

La Fig. 10 muestra el efecto hemostático de la solución peptídica acuosa en hemorragia de la incisión hepática en este ejemplo. No se observó ninguna gelificación ni ningún efecto hemostático en absoluto cuando se usó la solución peptídica acuosa IEIK9 como la capa superior en la superficie de la herida de hemorragia, pero la solución peptídica acuosa IEIK13 y solución peptídica acuosa KLD gelificaron después de aplicarse y no se observó hemorragia.

[Ejemplo 10]

Autoensamblaje de solución peptídica acuosa con bilis de conejo

Se evaluó el autoensamblaje de soluciones peptídicas acuosas con bilis de conejo con diferentes soluciones peptídicas acuosas.

<Materiales>

• Soluciones peptídicas acuosas. Las soluciones 1, 2 y 4 no son parte de la invención.

1. Solución peptídica acuosa 1,5 % (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)
2. Solución peptídica acuosa 1 % (secuencia peptídica: IEIK9, CPC Scientific, Inc)
3. Solución peptídica acuosa 1 % (secuencia peptídica: IEIK13, CPC Scientific, Inc)
4. Solución peptídica acuosa 1 % (secuencia peptídica: KLD, CPC Scientific, Inc)

Animales

Conejos blancos japoneses (3,0-4,0 kg, Japan White, convencionales, obtenidos de Funabashi Farm Co., Ltd.). Los animales se criaron con microgránulos de cría (JA Higashinihon Kumiai Shiryō) proporcionados en una habitación de cría controlada a una temperatura ambiente de 25 °C, una humedad del 65 % y un tiempo de iluminación de 12 horas (7:00-19:00), y agua proporcionada libremente con una botella de agua. El ayuno fue desde la mañana del día del ensayo, con agua proporcionada libremente.

<Método>

- Se administró por vía subcutánea a los conejos (3 mg/kg) inyección de Celactar 2 % (contenido de 2,0 g como xilazina en 100 ml, producto de Bayer Ltd.) y después se administró por vía intravenosa (10 mg/kg) ketamina (contenido de 50 mg como ketamina en 1 ml, producto de Fuji Chemical Industries, Ltd.) para anestesia.
- Los conejos se laparotomizaron por sección media, y se tomaron muestras de bilis de la vesícula biliar usando una aguja de inyección de 23G (Terumo Corp.).
- Se prepararon gotas de cada solución peptídica acuosa antes del autoensamblaje (diámetro: aproximadamente 5-8 mm), y la muestra de bilis se vertió suavemente sobre ella para cubrir la solución peptídica acuosa.
- Después de aproximadamente 30 segundos la bilis se retiró y se confirmó el autoensamblaje, y se rompió físicamente el gel autoensamblado con una aguja de inyección de 23G.

<Resultados>

La Fig. 11 muestra un ejemplo de autoensamblaje de las soluciones peptídicas acuosas en este ejemplo por bilis. Se confirmó el autoensamblaje inducido por bilis en todas las soluciones peptídicas acuosas excepto para IEIK9.

[Ejemplo de referencia 11]

Confirmación del efecto de embolización vascular de solución peptídica acuosa 3 % en embolización de vena porta de rata

Se inyectó una solución peptídica acuosa 3 % a través de la vena porta de rata, y se evaluó el efecto de embolización vascular.

<Materiales>

- Solución peptídica acuosa 3 % (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

Animales

Se criaron ratas SD (250 g, macho, obtenidas de Japan SLC, Inc.) en una habitación de cría controlada a temperatura/humedad: 22 ± 3 °C/50 ± 20 %, frecuencia de ventilación: 10-15 veces/hora, tiempo de iluminación: iluminación artificial durante 12 horas (8:00-20:00), y se les proporcionó acceso libre a alimento sólido CRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd.) usando un comedero metálico, con agua de grifo puesta a disposición libremente usando un distribuidor de agua automático.

<Método>

- Se sometió a las ratas a anestesia por inhalación con dietiléter (Kishida Chemical Co., Ltd.).
- Las ratas se laparotomizaron por sección media y se expusieron las venas porta.
- Se inyectó una parte de 4 ml de solución peptídica acuosa través del tallo de la vena porta con una aguja de inyección de 26G (Terumo Corp.), y se detuvo inmediatamente la hemorragia del sitio de perforación con solución peptídica acuosa.
- Los hígados se extrajeron 5 minutos después de la inyección y se fijaron inmediatamente con formalina al 10 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).
- El tejido se tiñó con hematoxilina eosina (HE) una semana después de fijar.

<Resultados>

Como se muestra en la Fig. 12, se confirmó la embolización de la vena porta con solución peptídica acuosa.

[Ejemplo de referencia 12]

Confirmación de autoensamblaje de solución peptídica acuosa con disolución de iopamidol

Se evaluó el autoensamblaje de una solución peptídica acuosa con disolución de iopamidol.

<Materiales>

Solución peptídica acuosa

5 Solución peptídica acuosa 3 % (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

- Medio de cultivo celular (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco)
- Iopamidol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

10 <Método>

- Se disolvieron 306,2 mg de iopamidol en 1 ml de solución peptídica acuosa 3 %.
- Se diluyó la solución peptídica acuosa 3 % que contenía iopamidol con agua MilliQ para preparar una solución peptídica acuosa 0,0468 %. Se añadió una parte de 300 µl de medio de cultivo celular en 6 partes, 50 µl cada vez, a 100 µl de la solución peptídica acuosa que contenía iopamidol 3 % y la solución peptídica acuosa que contenía iopamidol 0,0468 %, rodeando y poniendo en contacto la solución peptídica acuosa que contenía iopamidol 3 % y solución peptídica acuosa que contenía iopamidol 0,0468 %. A los 15 minutos después de la adición del medio de cultivo, se retiró el medio de cultivo circundante y se confirmó visualmente la gelificación.

20 <Resultados>

Como se muestra en la Fig. 13, se confirmó el autoensamblaje con las soluciones peptídicas acuosas que contenían iopamidol.

25 [Ejemplo de referencia 13]

Confirmación de autoensamblaje de solución peptídica acuosa 3 % que contiene iopamidol después de pase de microcatéter

30 Se evaluó el autoensamblaje de una solución peptídica acuosa 3 % con disolución de iopamidol.

<Materiales>

Solución peptídica acuosa

35 Solución peptídica acuosa 3 % (secuencia peptídica: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc)

- Medio de cultivo celular (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco)
- Iopamidol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)
- Microcatéter (2,4 Fr, 150/20, *Boston Scientific*)

<Método>

- Se disolvieron 306,2 mg de iopamidol en 1 ml de solución peptídica acuosa 3 %.
- Se descargó la solución peptídica acuosa 3 % que contenía iopamidol en el medio de cultivo celular a través de un catéter.

<Resultados>

50 Como se muestra en la Fig. 14, se confirmó el autoensamblaje con la solución peptídica acuosa al 3 % que contenía iopamidol.

LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> 3-D Matrix, Ltd.

<120> Agente oclisor tisular

<130> FP3240PCT

60 <140> EP 09819170
<141> 06-10-2009

<150> JP 20080259860
65 <151> 06-10-2008

<150> JP 20080316133
 <151> 11-12-2008
 <160> 4
 5 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 16
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido diseñado
 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 20 <400> 1
 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15
 25 <210> 2
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> péptido diseñado
 <220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 <400> 2
 Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile
 40 1 5 10
 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido diseñado
 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 55 <400> 3
 Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu
 1 5 10
 <210> 4
 60 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

	<220>	
	<223> péptido diseñado	
5	<220>	
	<221> MOD_RES	
	<222> (1)..(1)	
	<223> ACETILACIÓN	
10	<400> 4	
		Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile
		1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una solución acuosa de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 para uso en un método para detener la hemorragia en un sitio de daño tisular en el que la solución gelifica tras el contacto con el cuerpo.
2. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el péptido es IEIK13 que tiene la secuencia (Ac-(IEIK)₃-CONH₂).
- 10 3. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 en la que se ha retirado el exceso de líquido corporal del sitio de daño tisular.
- 15 4. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 en la que dicha hemorragia es de sangre en una condición de función de coagulación reducida inducida por adición de un anticoagulante.
5. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 en la que dicha hemorragia es de una superficie de herida de un órgano parenquimatoso.
- 20 6. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 en la que dicha hemorragia es hemorragia arterial y fleborragia.
7. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 en la que dicha hemorragia es de los pulmones.
- 25 8. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 en la que dicha hemorragia es hemorragia y filtración de líquido corporal de un sitio de escisión en un método de escisión de una sección de tejido mucoso que se ha elevado por infusión de un líquido al tejido mucoso.
- 30 9. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 en la que dicha hemorragia es de un sitio de escisión en desmucosación endoscópica y dicho método comprende la aplicación transcatéter de dicha composición.
10. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 en la que dicho método para detener la hemorragia comprende oclusión arteriovenosa o escleroterapia de varices.
- 35 11. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en forma de un hidrogel.

Fig. 1

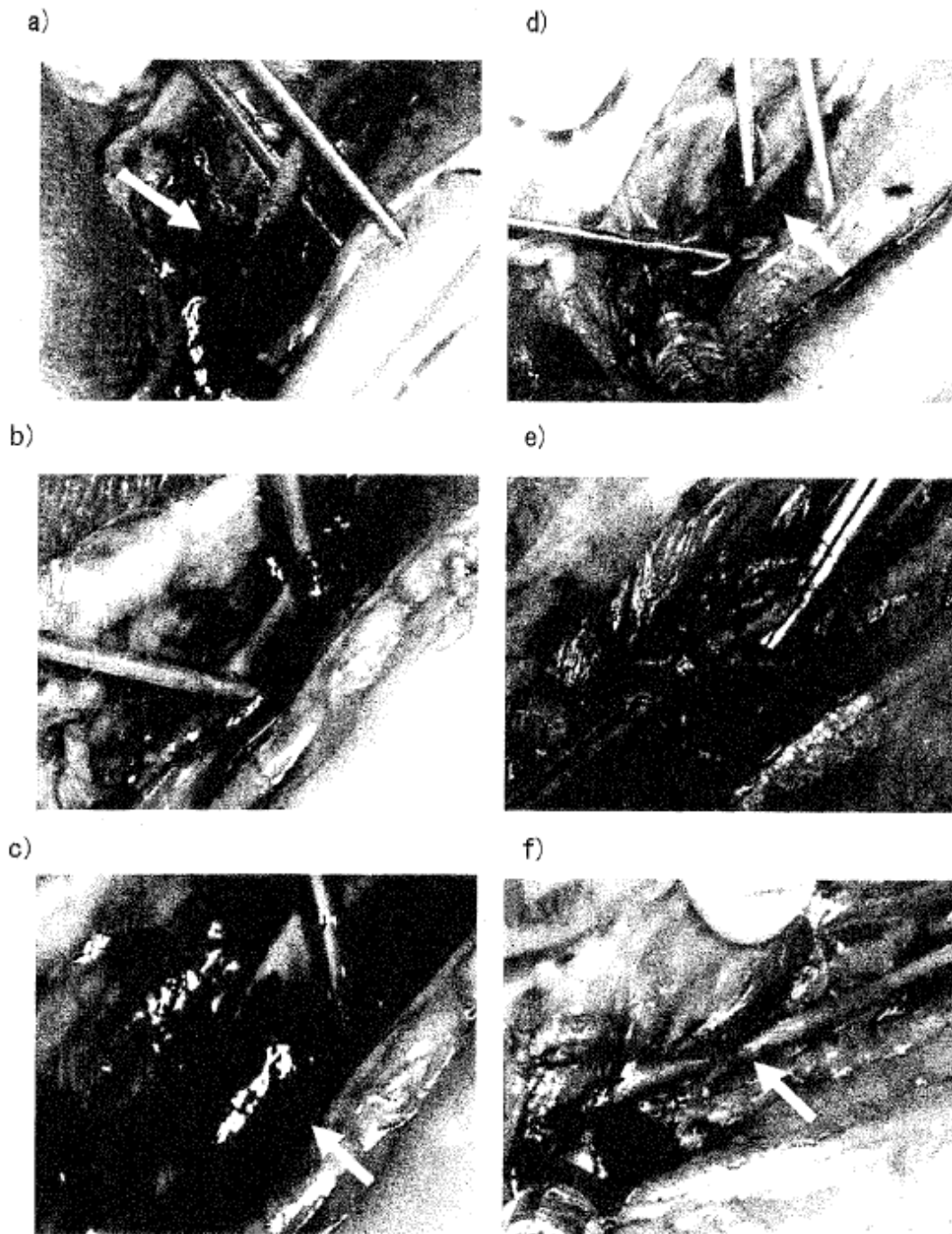


Fig. 2

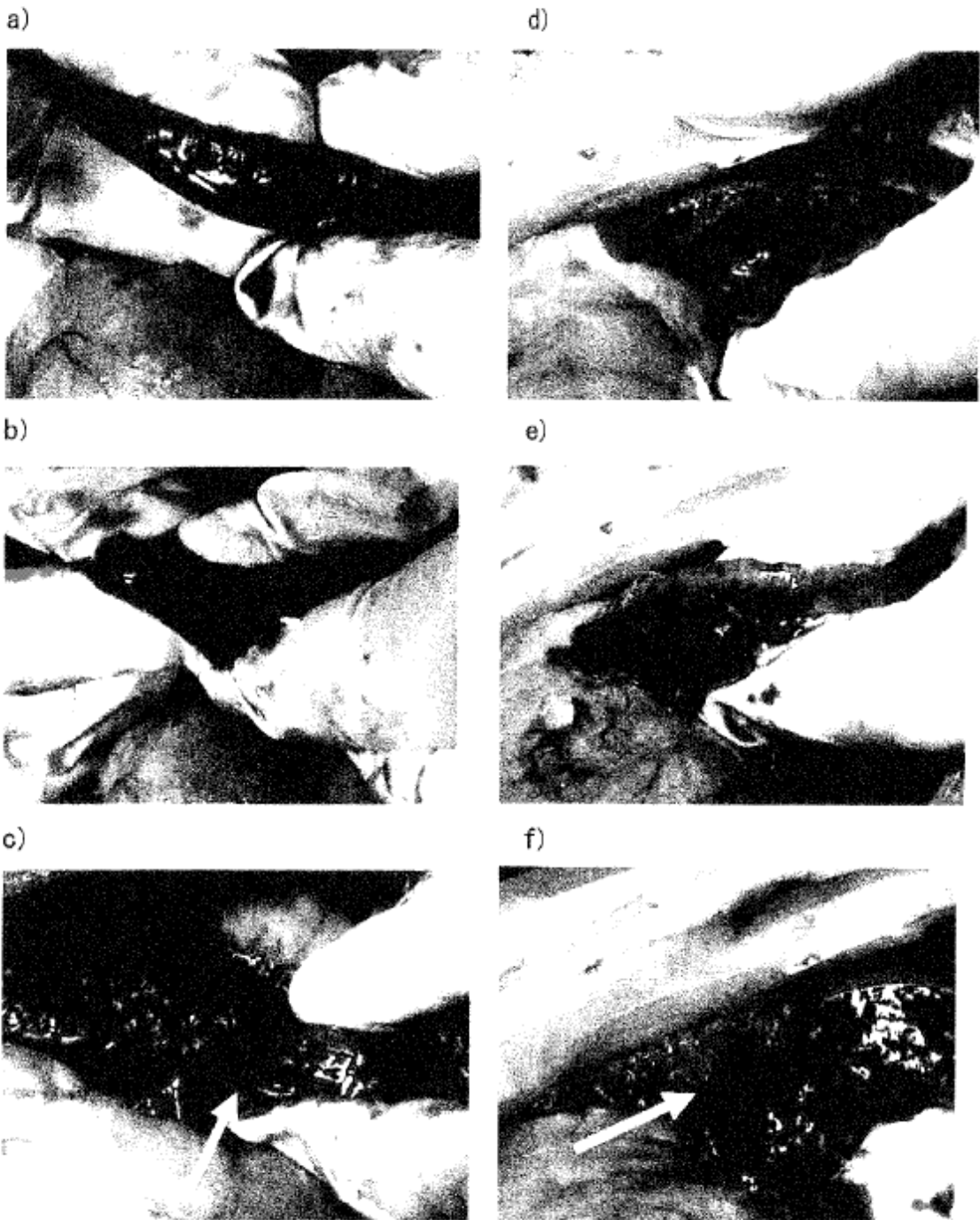


Fig. 3

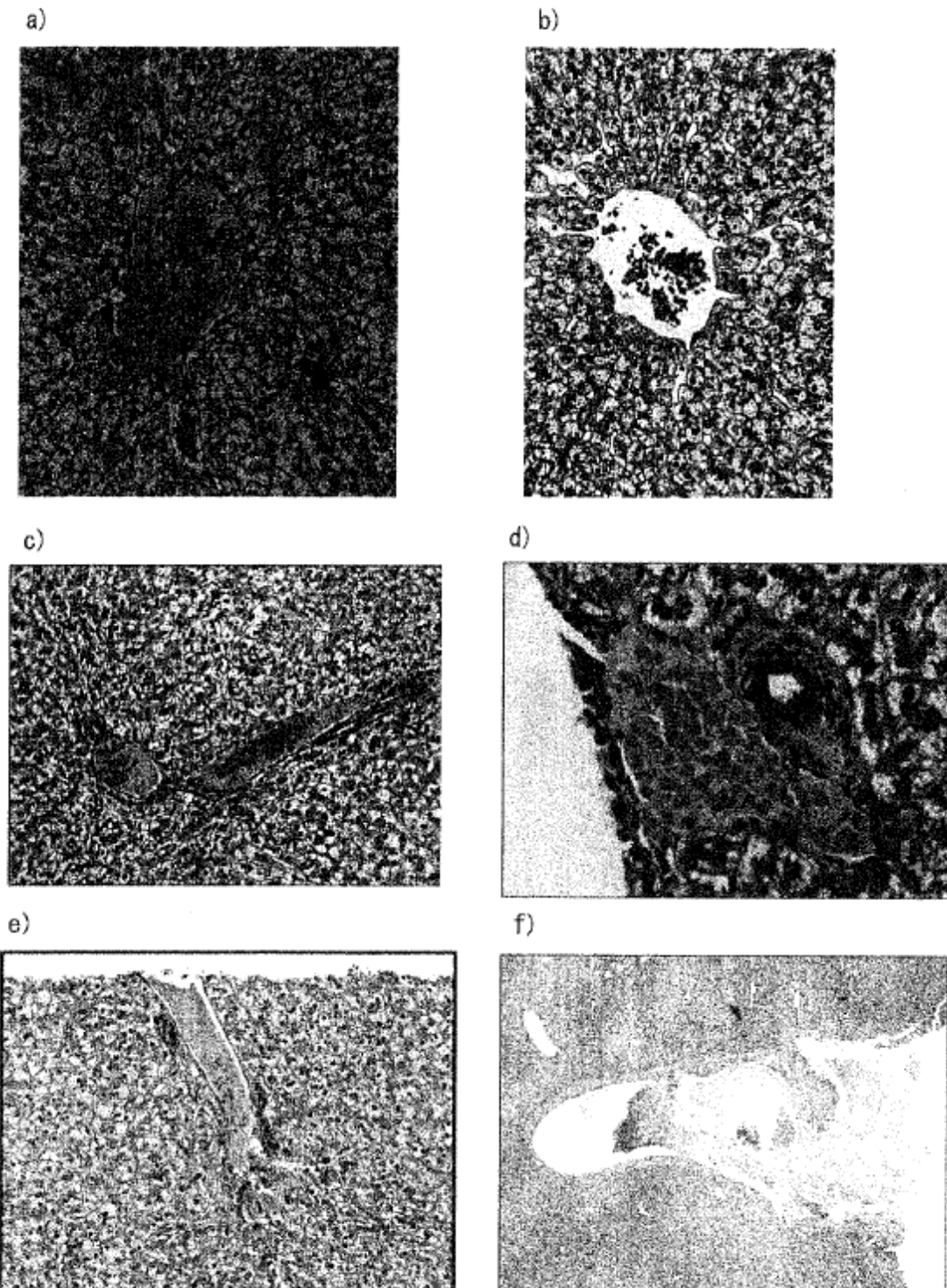
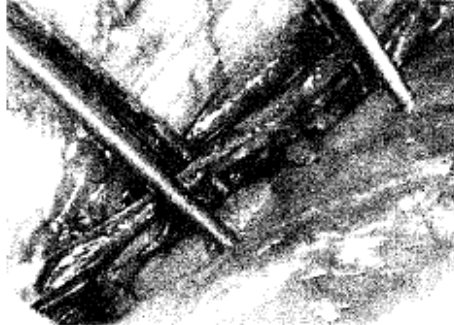
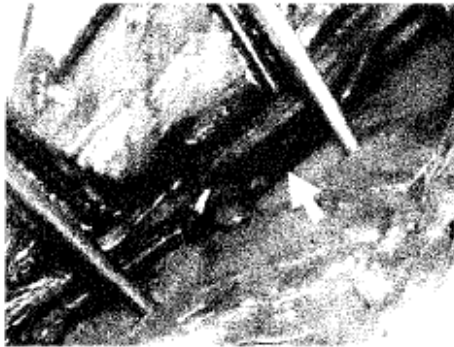


Fig. 4

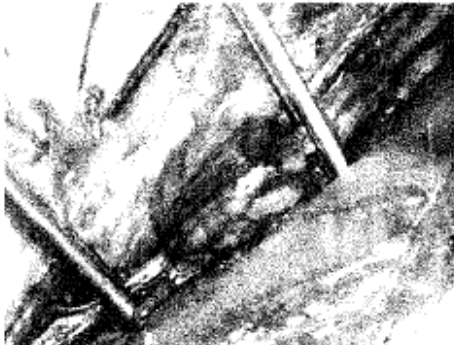
a)



b)



c)



d)

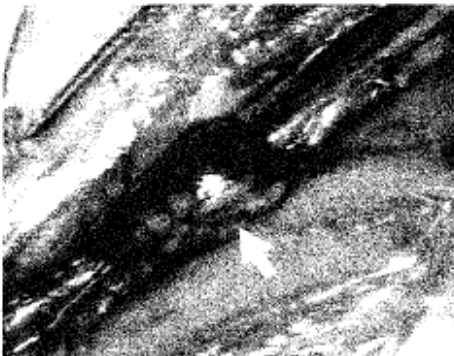


Fig. 5

a)



b)



c)



d)



Fig. 6

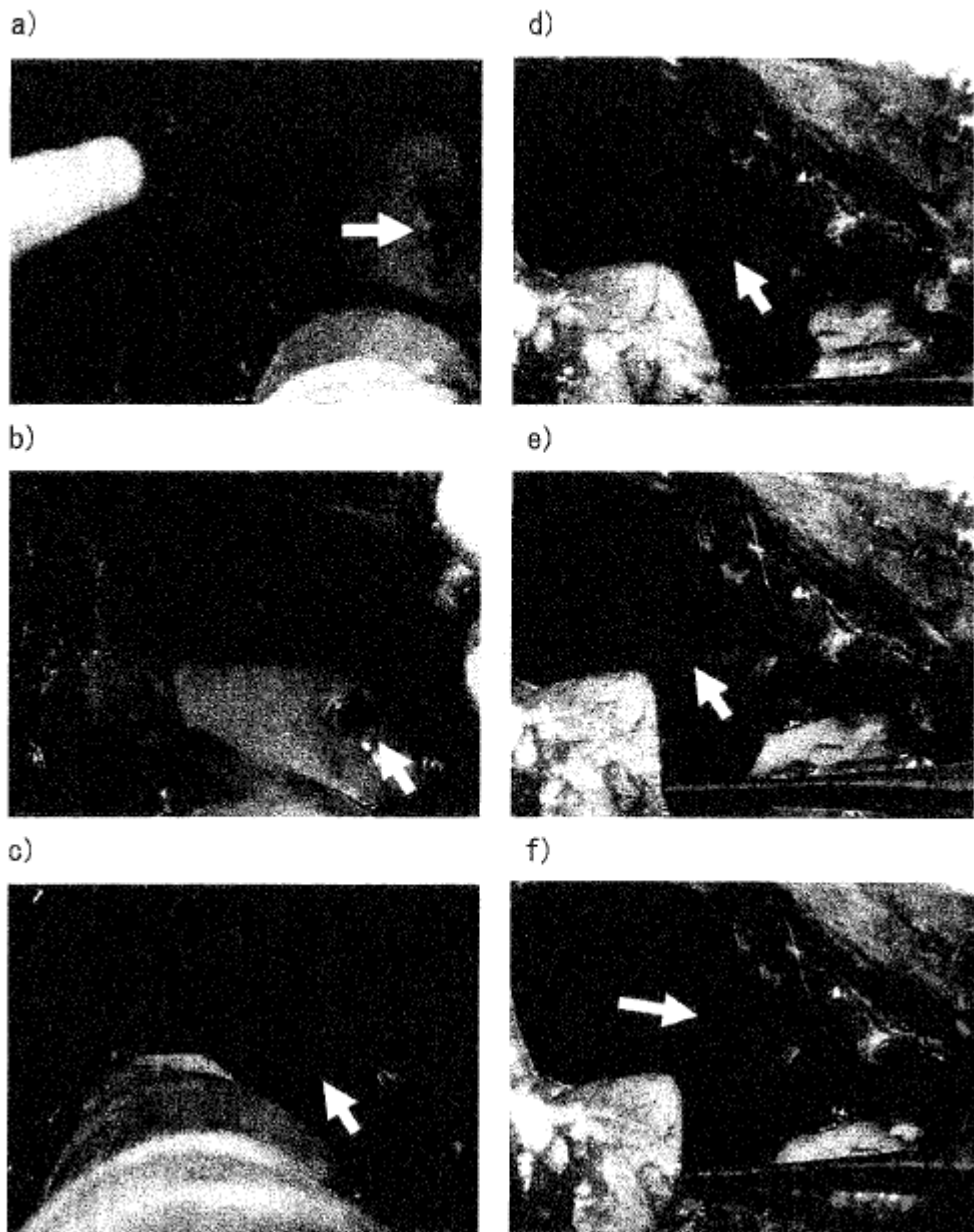
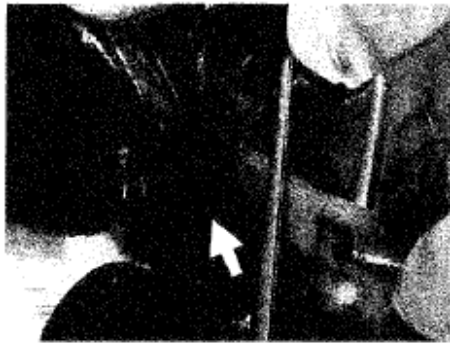


Fig. 7

a)



b)



c)

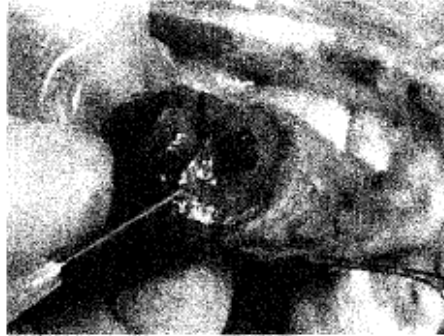


d)



Fig. 8

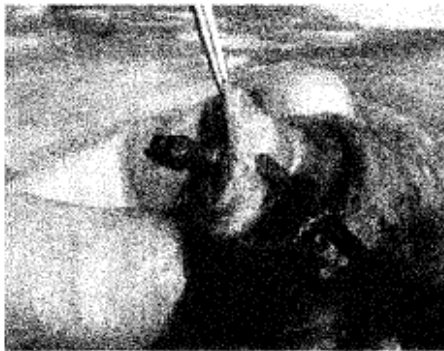
a)



b)



c)



d)



Fig. 9

a)



b)



c)



Fig. 10

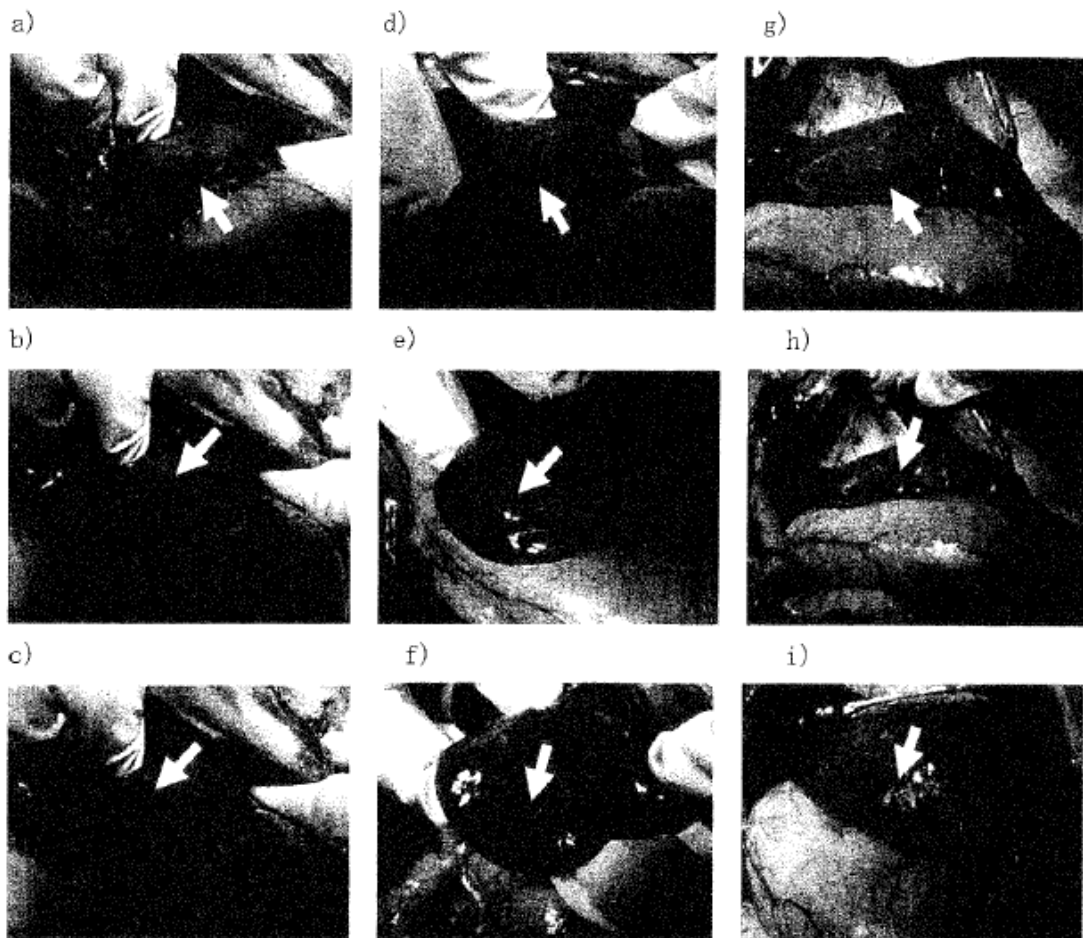


Fig. 11

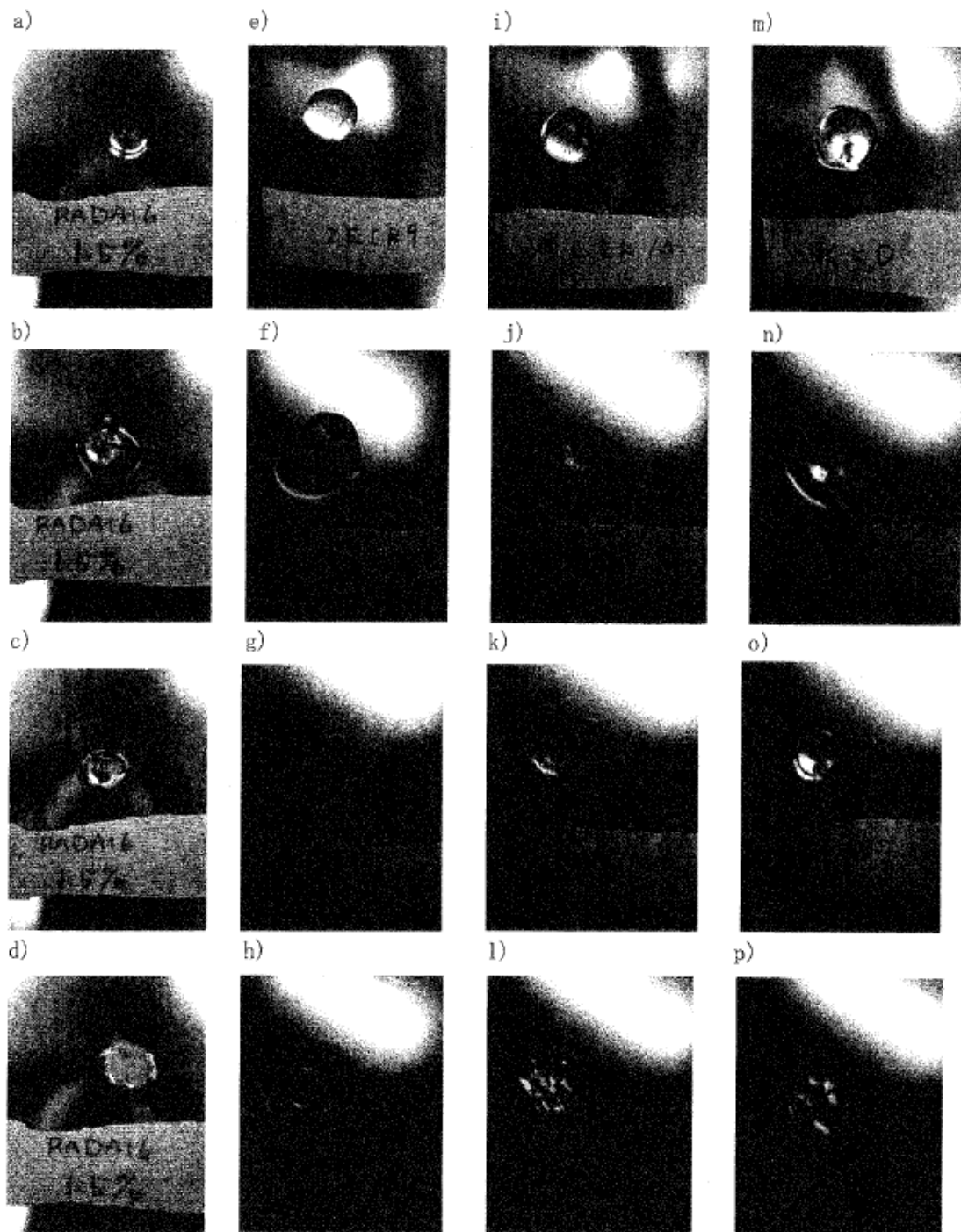
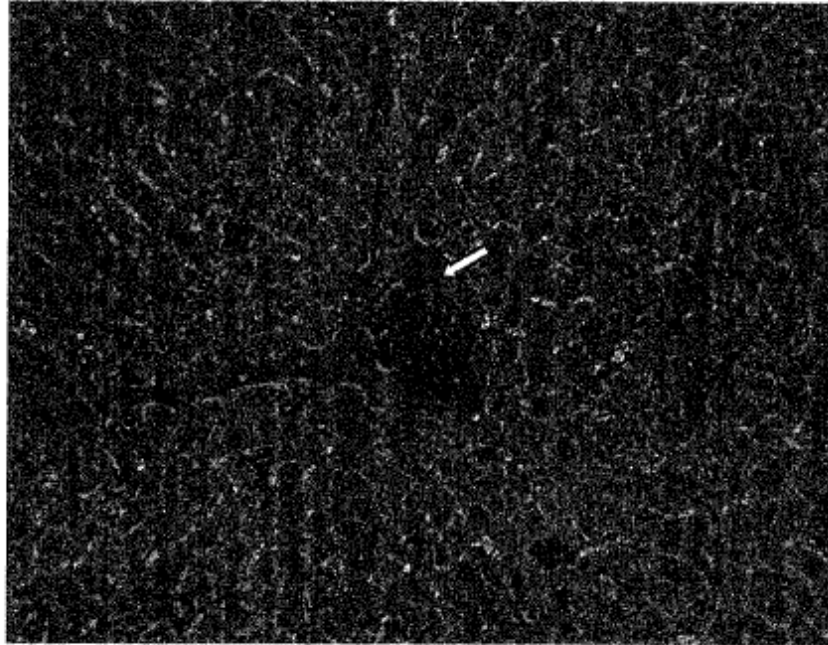


Fig. 12

a)



b)

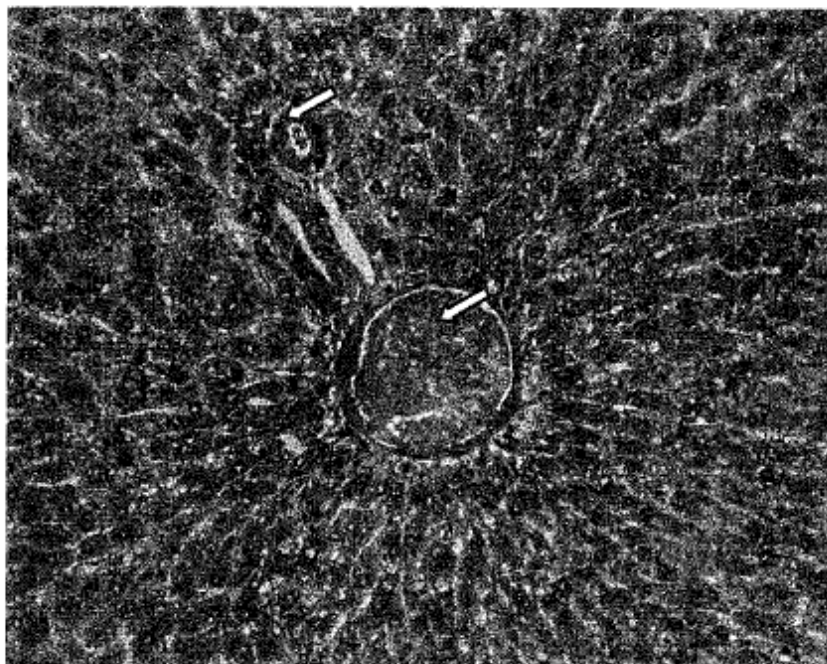


Fig. 13

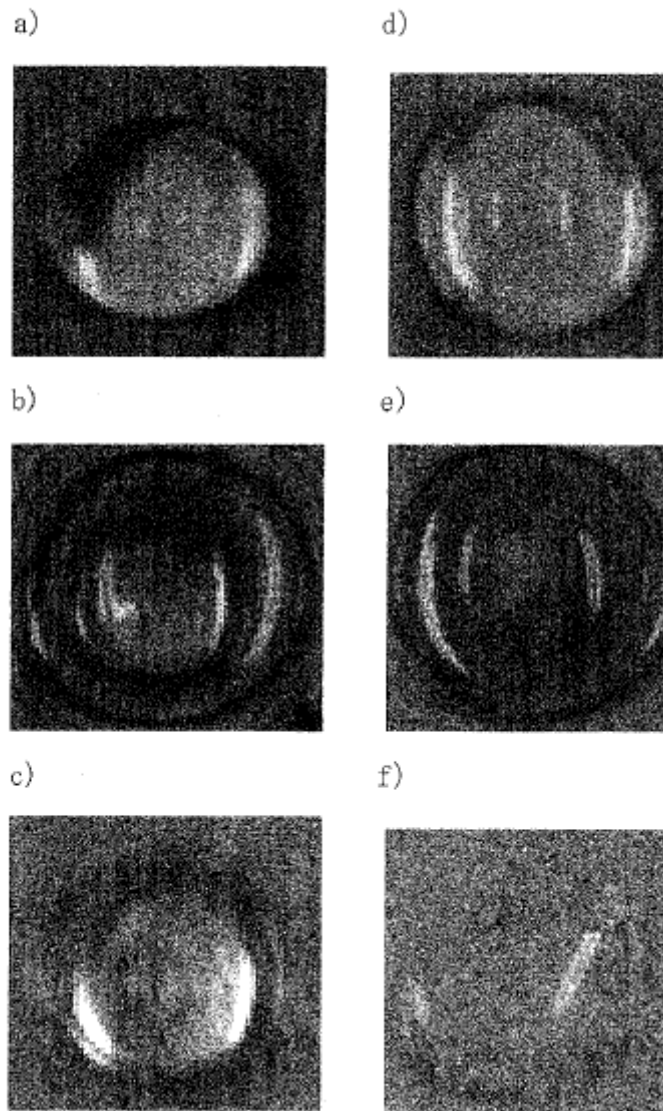


Fig. 14

